

## LES ASQUES ET LES ASCOSPORES DU *TERFEZIA CLAVERYI* CH. (TUBÉRALES)<sup>1</sup>

par M.C. JANEX-FAVRE et A. PARGUEY-LEDUC\*

**RÉSUMÉ.** — La structure des asques et des ascospores d'une Truffe des sables, le *Terfezia claveryi* Ch. (Tubérales) a été observée en microscopie photonique et électronique. Elle est comparée à celle de diverses Truffes du genre *Tuber*, précédemment décrites. Il apparaît une profonde homogénéité structurale entre ces deux genres : zonation caractéristique des constituants des asques jeunes, complexité de la paroi ascosporelle et de son ornementation; ces observations confirment l'appartenance de cette espèce à l'ordre des Tubérales. Toutefois, le *Terfezia claveryi* se distingue des *Tuber* par la composition de sa paroi ascosporelle (présence d'une endospore, s'ajoutant aux quatre couches de la paroi des *Tuber*) et la nature de son ornementation (mamelons, à contenu homogène et d'origine exosporique, au lieu d'épines, isolées ou réunies en réseau, à contenu fibrilleux ou réticulé et d'origine diverse, chez les *Tuber*).

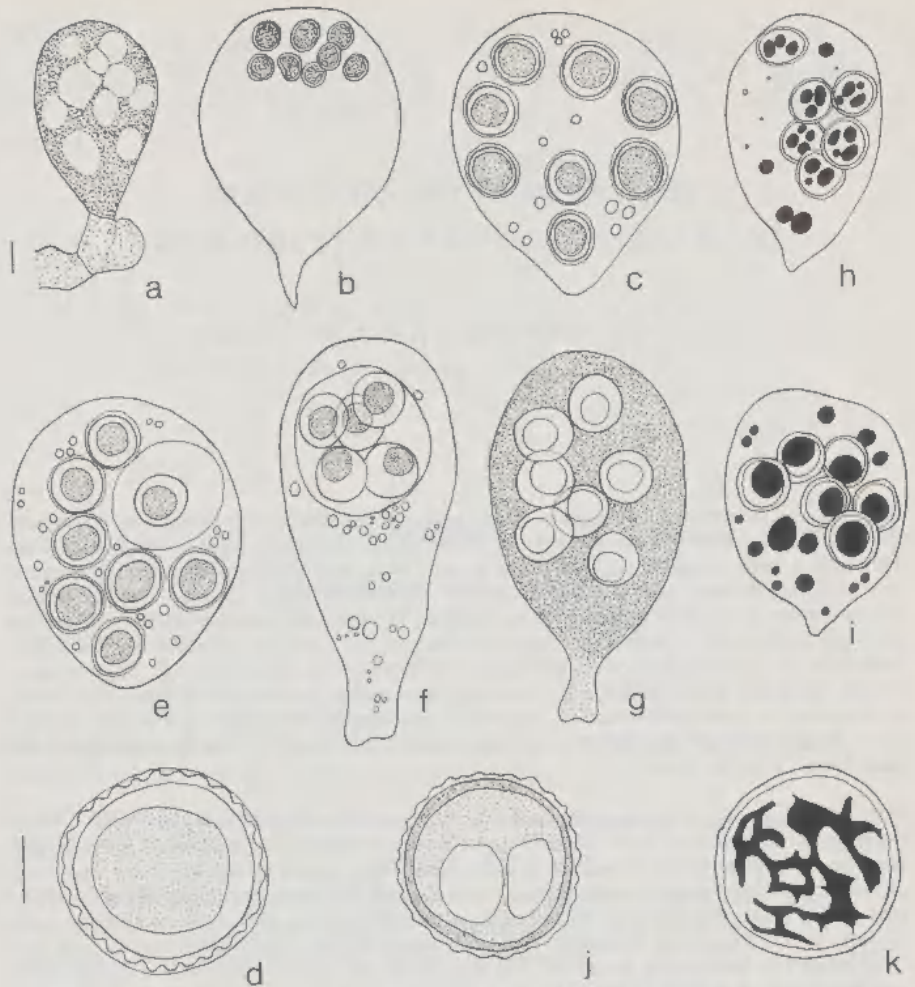
**SUMMARY.** — Ascii and ascospore structure of a sand Truffle (*Terfezia claveryi* Ch., Tuberales) has been observed with photonic and electron microscopes. Comparison is made with structure of several earlier described Truffles from *Tuber* genus. It appears that both genera present a structural homogeneity (typical zonation of the young ascii components, complexity of the ascospore wall and ornamentation) which confirms that *Terfezia claveryi* really belongs to the Tuberales. Therefore *Terfezia claveryi* differs from *Tuber* in ascospore wall composition (endospore is added to the four layers of *Tuber* wall) and the nature of its ornamentation (homogeneous exosporic mamilla instead of variously originated, detached or joined spines, with fibrillar or reticulate content, in *Tuber*).

**MOTS CLEFS :** asque, ascospore, paroi, ultrastructure, Tubérales, *Terfezia*.

Ayant eu la possibilité d'étudier les asques et ascospores de diverses espèces de Truffes du genre *Tuber* (JANEX-FAVRE & PARGUEY-LEDUC, 1976; JANEX-FAVRE, 1977; PARGUEY-LEDUC & JANEX-FAVRE, 1977a - b; JANEX-FAVRE & PARGUEY-LEDUC, 1980; PARGUEY-LEDUC & JANEX-FAVRE, 1981; JANEX-FAVRE & PARGUEY-LEDUC, 1983), nous avons pensé opportun d'élargir cette étude en examinant des Truffes des sables (divers

1. Travail réalisé dans le cadre d'un programme Terfez INRA/KSIR.

\* Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Cryptogamie - 9, quai Saint-Bernard - F 75005 Paris.



Figures a à k : asques et ascospores du *Terfezia claveryi*, observés en microscopie photonique. Échelle : 10  $\mu\text{m}$  pour les asques ; 5  $\mu\text{m}$  pour les ascospores.

Fig. a à f : sans coloration. a, asque très jeune ; b, asque peu après l'ascosporogénèse : jeunes ascospores groupées au sommet ; c, asque plus âgé, à ascospores réparties dans tout l'asque et pourvues d'une paroi lisse ; d, coupe optique d'une ascospore ; e, asque : une ascospore est entourée d'une épaisse zone circulaire claire ; f, idem, mais toutes les ascospores sont regroupées dans une zone claire unique. — Fig. g : asque coloré par le Lugol ; seul le pied est dépourvu de glycogène. — Fig. h et i : asques colorés par le bleu BZL, montrant des globules lipidiques et leur évolution à l'intérieur des ascospores. — Fig. j : coupe optique d'une ascospore colorée par le rouge de ruthénium. — Fig. k : vue polaire d'une ascospore colorée par le bleu Coton.

Figures a to k : asci and ascospores in *Terfezia claveryi* (photonic microscope). Scale : 10  $\mu\text{m}$  (asci), 5  $\mu\text{m}$  (ascospores).

Fig. a to f : without staining. a, very young ascus ; b, ascus just after ascosporogenesis : young ascospores grouped at the top ; c, older ascus, with smooth-walled ascospores distributed in the whole ascus ; d, optical section of an ascospore ; e, ascus : one ascospore is surrounded by a thick clear circular area ; f, Id. : the ascospores are grouped in a single clear area. — Fig. g : ascus stained with Lugol ; glycogen is lacking in the foot-part. — Fig. h and i : asci stained with BZL blue : evolution of the oil droplets. — Fig. j : optical section of an ascospore stained with ruthenium red. — Fig. k : external view of an ascospore stained with Cotton blue.

*Terfezia* : *T. claveryi* Ch., *T. leonis* Tul. et *T. leptoderma* Tul.) encore très mal connues. L'étude que nous rapportons ici est relative au *Terfezia claveryi* Ch. Les échantillons observés nous ont été procurés par G. CHEVALIER\* ; obtenus à l'état frais sur un marché du Koweït, ils provenaient de Syrie ou d'Arabie séoudite.

L'étude des asques et ascospores du *T. claveryi* comporte des observations en microscopie photonique et en microscopie électronique\*.

## I. — RÉSULTATS DES OBSERVATIONS EFFECTUÉES EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

L'étude des asques et ascospores en microscopie photonique a été effectuée à l'aide des colorants usuels : bleu Coton, bleu de crésyle, bleu BZL, encre, Lugol, rouge Congo, rouge de ruthénium, vert Visba.

Les simples montages à l'eau montrent que les jeunes asques, formés à partir d'une dangeardie ascogène et en forme de massue, ont un contenu très vacuolisé (Fig. a) ; les ascospores se forment dans la partie supérieure de l'asque : d'abord groupées (Fig. b) elles se dispersent ensuite dans le volume ascas devenu plus ou moins globuleux (Fig. c). En nombre variable (3 à 8), les ascospores sont globuleuses, d'abord lisses (Fig. c) et finalement pourvues d'une ornementation qui, en coupe optique, prend l'aspect de mamelons dont les sommets sont réunis par une fine membrane (Fig. d). Au cours de l'observation dans l'eau, nous avons noté une modification des parois ascosporales : au début de l'hydratation, certaines ascospores apparaissent entourées d'une épaisse zone circulaire claire, bien visible lorsque les ascospores sont relativement écartées les unes des autres (Fig. e) et qui régresse ensuite ; lorsque les ascospores sont groupées, ces zones sont réunies en une sorte de sac unique (Fig. f).

Les réserves de l'asque comportent du glycogène, très abondant dans l'épiplasme et absent dans le pied (coloration par le Lugol, Fig. g) et des lipides, mis en évidence par le bleu BZL, à la fois dans l'épiplasme et dans les ascospores ; dans celles-ci, les globules lipidiques, d'abord petits et multiples (Fig. h), tendent à se réunir au stade final en un volumineux globule unique (Fig. i).

La paroi de l'asque ne se colore nettement que par l'encre : elle est donc de nature chitino-cellulosique. La paroi des ascospores comporte deux couches : une couche interne, que seul le rouge de ruthénium colore nettement (Fig. j), et qui contient donc de la pectine, et une couche externe ; celle-ci retient pratiquement tous les colorants utilisés, ce qui indique une nature complexe ; de plus, elle présente une ornementation superficielle, particulièrement bien colorée

\* Nous avons plaisir à remercier G. CHEVALIER (INRA, Clermont-Ferrand) qui a suscité cette étude en nous proposant aimablement de récolter pour nous des Truffes des sables, ainsi que C. FOURNIGAULT et N. JAMPSIN pour leur précieuse collaboration technique.

par le bleu Coton (et donc plus riche en callose); elle apparaît, en vue polaire, sous forme de plaques irrégulières réunies par des isthmes (Fig. k).

## II. — RÉSULTATS DES OBSERVATIONS EFFECTUÉES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

L'étude en microscopie électronique à transmission a été effectuée à l'aide des méthodes habituelles : double fixation par le glutaraldéhyde à 4 % et le tétr oxyde d'osmium avec tampon de Sørensen; inclusion dans la résine de Spurr; traitement des coupes par la technique de Thiéry ou les contrastants usuels (citrate de plomb et acétate d'uranyle).

### A - ORGANISATION DE L'ASQUE AU MOMENT DE L'ASCOSPOROGENESE

Au moment de l'ascosporogénèse, l'asque du *T. claveryi* présente, comme ceux des Truffes du g. *Tuber* (PARGUEY-LEDUC & JANEX-FAVRE, 1977 a - b, 1981), une très nette polarité dans la répartition de ses constituants.

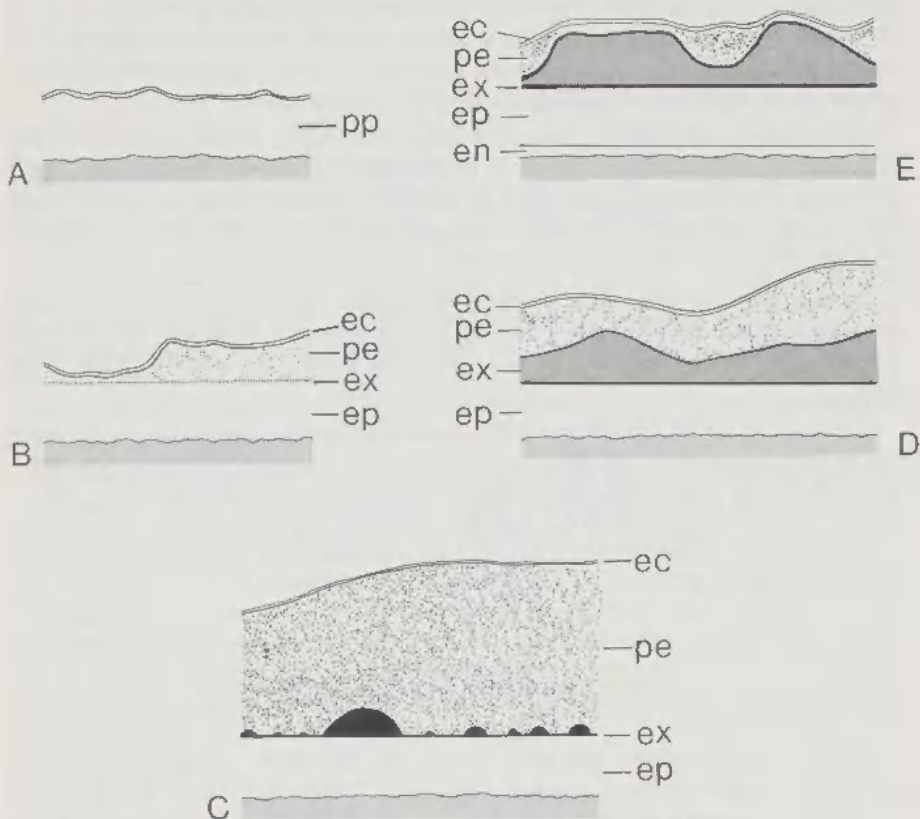
Au sommet de l'asque se localisent le noyau diploïde, puis les futurs noyaux ascosporaux entourés par un cytoplasme finement granuleux (Fig. 1). Au-dessous sont tout d'abord regroupées de nombreuses vacuoles, de taille diverse, d'abord claires puis contenant ensuite chacune un précipité très dense aux électrons (Fig. 1). Ensuite apparaissent des globules lipidiques situés de part et d'autre de la zone à vacuoles; ils sont très régulièrement alignés en limite de la zone sous-jacente (Fig. 2). Celle-ci, très volumineuse, occupe tout le reste du volume de l'asque et est très riche en glycogène, sous la forme de rosettes caractéristiques.

A ce stade des lomasomes sont visibles sur le plasmalemme, à proximité des futurs noyaux sporaux. Cette disposition rappelle, de façon précise, ce que nous avons décrit chez diverses Truffes du genre *Tuber*; nous n'avons malheureusement pu observer ni le mécanisme de l'ascosporogénèse, ni la formation de la paroi primordiale des ascospores; celle-ci, rappelons-le, dérive d'un diverticule lomasomien chez le *Tuber aestivum* (PARGUEY-LEDUC & JANEX-FAVRE, 1977 a).

### B - ÉVOLUTION DE LA PAROI ASCOSPORALE

— **La paroi primaire** : au plus jeune stade observé (Fig. 3, 4 et schéma A), les deux feuilletts de la paroi primaire (pp) des ascospores sont déjà nettement écartés l'un de l'autre; sur le feuillet externe s'appliquent des éléments du réticulum endoplasmique (flèche).

— **Formation de la partie secondaire de la paroi** : de place en place, autour du corps sporal s'ébauche la périspore (pe), sous forme d'îlots lenticulaires séparés (Fig. 4); elle devient ensuite continue, mais irrégulière, comportant des



Schémas A à E : évolution de la paroi ascospore du *Terfezia claveryi*.

ec : ectospore; en : endospore; ep : épisporium; ex : exospore; pe : périspore; pp : paroi primaire.

Diagrams A to E : evolution of the ascospore wall in *Terfezia claveryi*.

ec : ectospore; en : endospore; ep : episporium; ex : exospore; pe : perispore; pp : primary wall.

boursoufflures successives, qui contiennent quelques dépôts, très dispersés au début (Fig. 5), puis beaucoup plus denses (Fig. 6). Extérieurement, la périspore (pe) est limitée par l'ectospore (ec) formée par le feuillet externe de la paroi primaire auquel se sont accolés des éléments du réticulum endoplasmique (Fig. 5 et schéma B).

Corrélativement, au-dessous de la périspore se différencie une exospore (ex) pelucheuse, appliquée sur la partie plus interne de la paroi, qui demeure inchangée et représente une épisporium (ep).

— **Évolution de l'exospore et formation de l'endospore** : au stade suivant, l'exospore devient plus marquée, plus sombre et irrégulièrement épaissie (Fig. 7).

En divers points de sa surface se forment des masses hémisphériques lenticulaires très sombres aux électrons, de taille très inégale, saillantes à l'intérieur de la périspore. Par la suite une couche sombre continue, mince, se substitue à la couche pelucheuse (Fig. 8); l'ensemble de cette couche et les masses lenticulaires qu'elle porte représentent l'exospore (Fig. 8, 9 et schéma C).

Les masses lenticulaires exosporiques ont tendance à confluer entre elles; en même temps elles s'épaississent et leur contenu s'éclaircit légèrement (Fig. 9 et schéma D). Elles sont généralement limitées extérieurement par un fin liseré noir, quelquefois par une couche régulière sombre de plus grande épaisseur (Fig. 10).

Dans la partie interne de l'épispore, appliquée contre le plasmalemme, apparaît une nouvelle couche pelucheuse, un peu plus sombre (Fig. 9 et 11); au stade suivant, elle devient régulière et constitue une endospore (en, Fig. 12 et schéma E).

Corrélativement à l'évolution de l'exospore se produit une rétraction progressive de la périspore (Fig. 9, 10, 11 et schémas D, E). Celle-ci, limitée par l'ectospore, finit par s'appliquer sur le sommet des mamelons exosporiques, tandis qu'elle remplit les dépressions qui les séparent. Ces mamelons constituent l'ornementation superficielle de la paroi ascosporale, déjà visible en microscopie photonique (Fig. e).

## COMPARAISONS ET CONCLUSION

Parmi les observations que nous venons de rapporter, certaines confirment nettement l'appartenance du genre *Terfezia* à l'ordre des Tubérales. En effet, les caractères suivants se retrouvent conjointement dans le genre *Tuber* et chez le *Terfezia claveryi* :

- les asques, formés sur des dangardies ascogènes, deviennent plus ou moins globuleux à l'état adulte;
- au moment de l'ascosporogénèse, les constituants de l'asque sont répartis en zones superposées; il est à noter que chez le *Terfezia claveryi* aux zones observées chez diverses espèces de Truffes (PARGUEY-LEDUC & JANEX-FAVRE, 1977 b, 1981) s'ajoute une couche supplémentaire, riche en globules lipidiques;
- l'ascosporogénèse se déroule dans la partie sommitale de l'asque; peu après leur formation les ascospores migrent et se répartissent dans tout le volume ascial; leur nombre est souvent inférieur à huit;
- les ascospores adultes ont une paroi ornementée.

Quelques différences apparaissent toutefois entre les *Tuber* et le *Terfezia claveryi* :

- les ascospores du *T. claveryi* ne sont pas regroupées à l'intérieur d'un sac post-sporal. En effet, la zone circulaire claire qui entoure parfois les jeunes

ascospores dans les montages à l'eau (Fig. f), n'est pas l'équivalent du sac post-sporal des *Tuber* puisqu'elle correspond à une confluence des périspores, qu'elle est éphémère et qu'on ne la retrouve jamais sur les coupes observées en microscopie électronique;

- la paroi des ascospores du *T. claveryi* comporte, en plus des couches déjà observées chez les espèces du g. *Tuber*, une endospore. La présence de cette endospore constitue un argument décisif dans la discussion relative à la dénomination des différentes couches de la paroi ascosporale. Dans notre travail synthétique sur la paroi des ascospores de Truffes du g. *Tuber* (JANEX-FAVRE & PARGUEY-LEDUC, 1983), nous avons en effet souligné la difficulté concernant l'interprétation de la couche la plus interne de cette paroi, qui pouvait être soit une épispore, soit une endospore. Nous avons retenu le terme d'épispore, notamment par comparaison avec ce que PERREAU (1967, 1976) a décrit chez les Basidiomycètes; ce choix est tout à fait conforté par l'observation de la paroi des ascospores du *Terfezia claveryi* où une endospore s'ajoute effectivement à la base de la paroi;

- l'ornementation de la paroi des ascospores du *Terfezia claveryi* est moins complexe que celle des *Tuber*; elle comporte de simples mamelons à contenu peu organisé, au lieu d'épines à contenu bien structuré, fibrilleux ou réticulé.

Ces différences de structure entre les ascospores de divers *Tuber* et du *Terfezia claveryi* paraissent de faible importance. Au contraire, les caractères remarquablement constants des asques semblent fondamentaux : s'ajoutant à ceux des ascospores indiqués par MALENÇON (1938), ils permettent de rattacher sans réserve le *Terfezia claveryi* à l'ordre des Tubérales.

#### BIBLIOGRAPHIE

- JANEX-FAVRE M.C. et PARGUEY-LEDUC A., 1976 - La formation des ascospores chez deux Truffes : *Tuber rufum* Pico et *Tuber aestivum* Vitt. (Tubéracées). *Compt. Rend. Heb. Séances Acad. Sci.*, Sér. D, 283 : 1173-1175.
- JANEX-FAVRE M.C., 1977 - La paroi des ascospores du *Tuber rufum* Pico. *Bull. Soc. Mycol. France* 93 : 407-424.
- JANEX-FAVRE M.C. et PARGUEY-LEDUC A., 1980 - Formation et évolution des ascospores du *Tuber mesentericum* Vitt. *Bull. Soc. Mycol. France* 96 : 225-237.
- JANEX-FAVRE M.C. et PARGUEY-LEDUC A., 1983 - Étude ultrastructurale des asques et des ascospores de Truffes du genre *Tuber*. II. Les ascospores. *Cryptogamie, Mycol.* 4 : 353-373.
- MALENÇON G., 1938 - Les Truffes européennes - Historique - Morphogénie - Organographie - Classification - Culture. *Rev. Mycol.*, mém. hors-série n° 1, 92 p.
- PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M.C., 1977 a - L'ornementation des ascospores chez le *Tuber aestivum* Vitt. In : Travaux dédiés à G. VIENNOT-BOURGIN. Paris, Soc. Franç. Phytopathol. : 307-323.

- PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M.C., 1977 b – L'organisation des asques de deux Truffes : *Tuber rufum* Pico et *Tuber aestivum* Vitt. *Rev. Mycol.* 41 : 1-32.
- PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M.C., 1981 – Étude ultrastructurale des asques et des ascospores de Truffes du genre *Tuber*. I. Les asques. *Cryptogamie, Mycol.* 2 : 37-53.
- PERREAU-BERTRAND J., 1967 – Recherches sur la différenciation et la structure de la paroi sporale chez les Homobasidiomycètes à spores ornées. *Ann. Sci. Nat., Bot. et Biol. Vég.*, Sér. 12, III : 639-745.
- PERREAU J., 1976 – Développement, morphologie et structure de la basidiospore (chez les Homobasidiomycètes). *Inform. Sci.* 31 : 55-75.

+

\*

Figures 1 à 12 : photographies d'asques et d'ascospores du *Terfezia claveryi* observés en microscopie électronique.

Coupes contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb : figures 2, 3, 4, 8, 9 et 10.

Coupes traitées par la technique de Thiéry : figures 1, 5, 6, 7, 11 et 12.

Figures 1 to 12 : electron micrographs of asci and ascospores in *Terfezia claveryi*.

Contrast : uranyl acetate and lead citrate (fig. 2, 3, 4, 8, 9 and 10).

Thiery test : fig. 1, 5, 6, 7, 11 and 12.



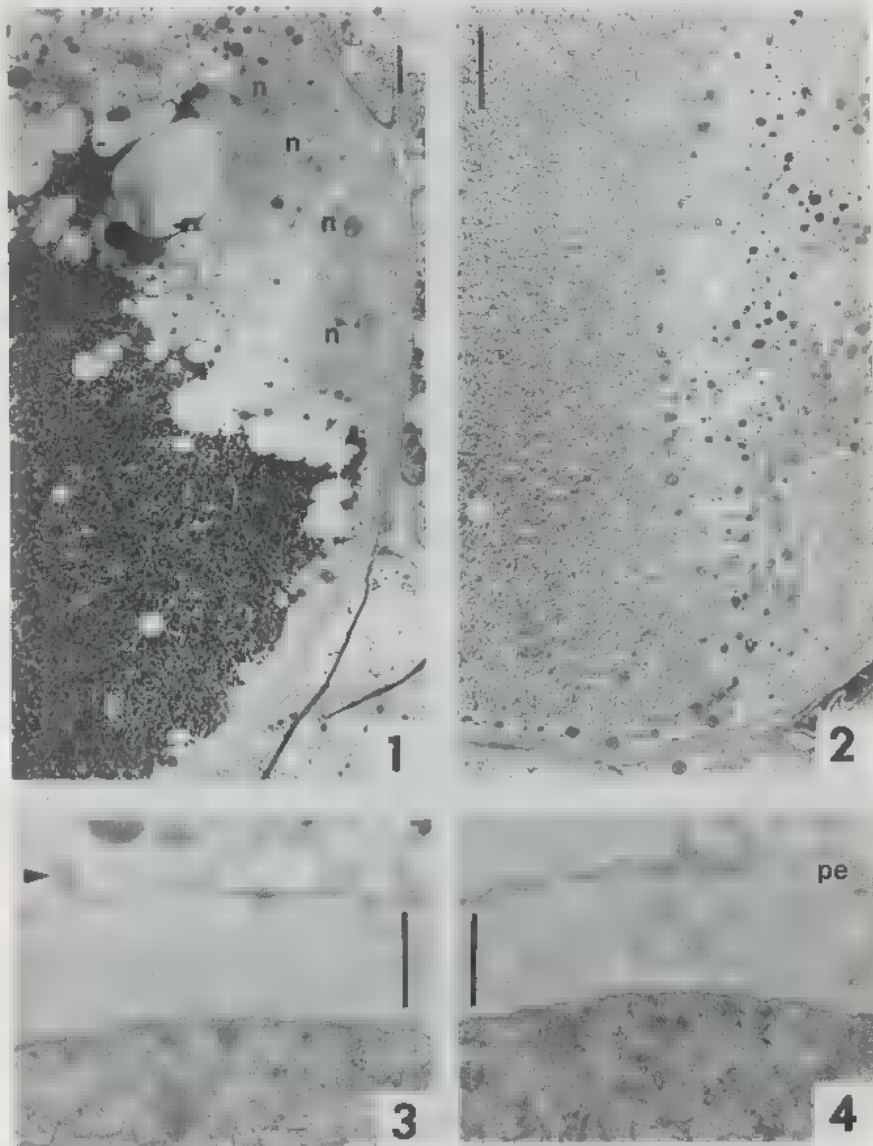


Fig. 1 et 2. — jeunes asci du *Terfezia claveryi* : parties sommitales montrant la zonation caractéristique des constituants; n : noyau. Échelle : 2  $\mu$ m.

Fig. 3 et 4. — paroi primaire des ascospores du *Terfezia claveryi*; pe : périspore en formation; flèche : réticulum endoplasmique. Échelle : 0,5  $\mu$ m.

Fig. 1 and 2. — Young asci in *Terfezia claveryi* : apical area showing typical zonation. n : nucleus. Scale : 2  $\mu$ m.

Fig. 3 and 4. — Primary ascospore wall in *Terfezia claveryi*. pe : forming perispore; arrow indicates the endoplasmic reticulum. Scale : 0,5  $\mu$ m.

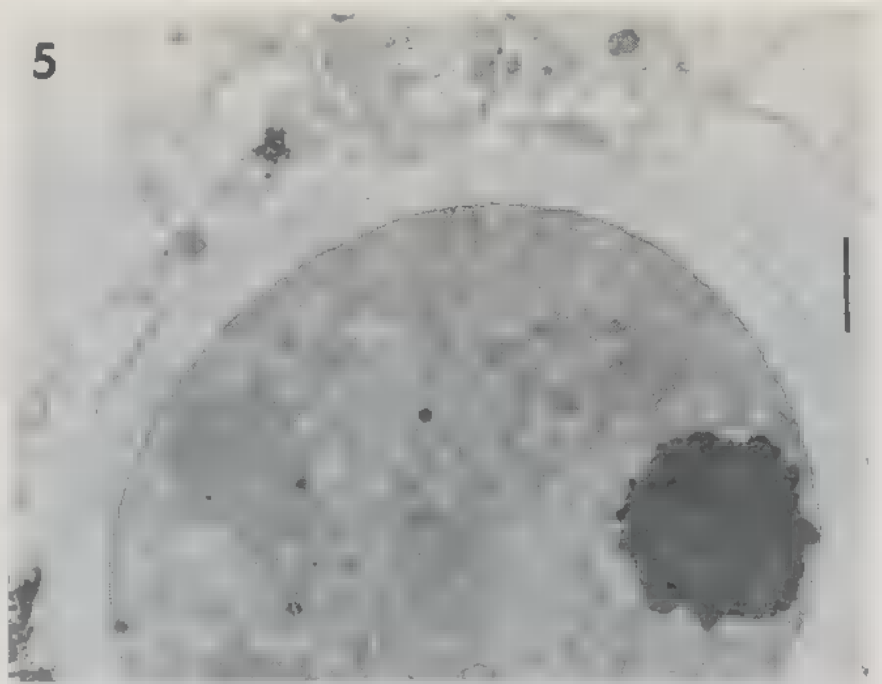


Fig. 5 et 6. — formation de la partie secondaire de la paroi des ascospores du *Terfezia claveryi*. ec : ectospore; ep : épispore; ex : exospore; pe : périspore. Échelle : 1  $\mu$ m.

Fig. 5 and 6. — formation of the secondary part of the wall in *Terfezia claveryi*. ec : ectospore; ep : epispore; ex : exospore; pe : perispore. Scale : 1  $\mu$ m.

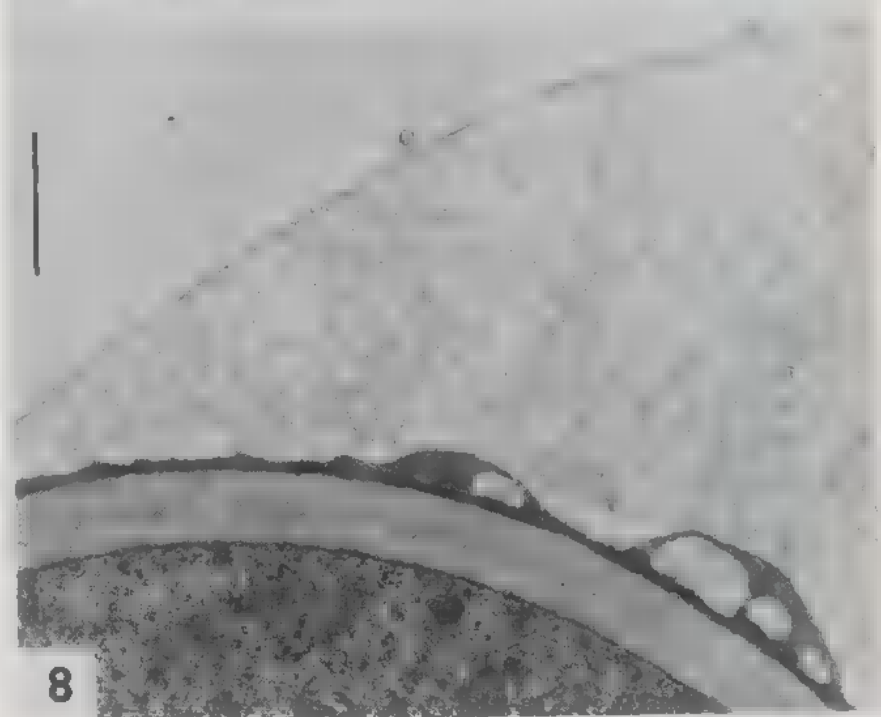
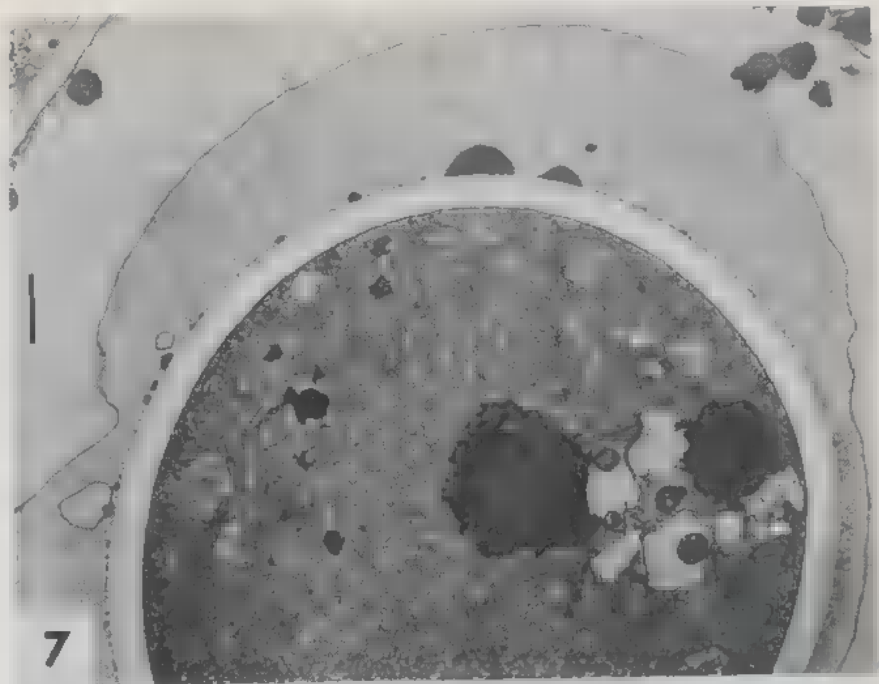


Fig. 7 et 8. — paroi des ascospores du *Terfezia claveryi* : évolution de l'exospore. Échelle : 1  $\mu$ m.  
Fig. 7 et 8. — ascospore wall in *Terfezia claveryi* ; exospore evolution. Scale : 1  $\mu$ m.

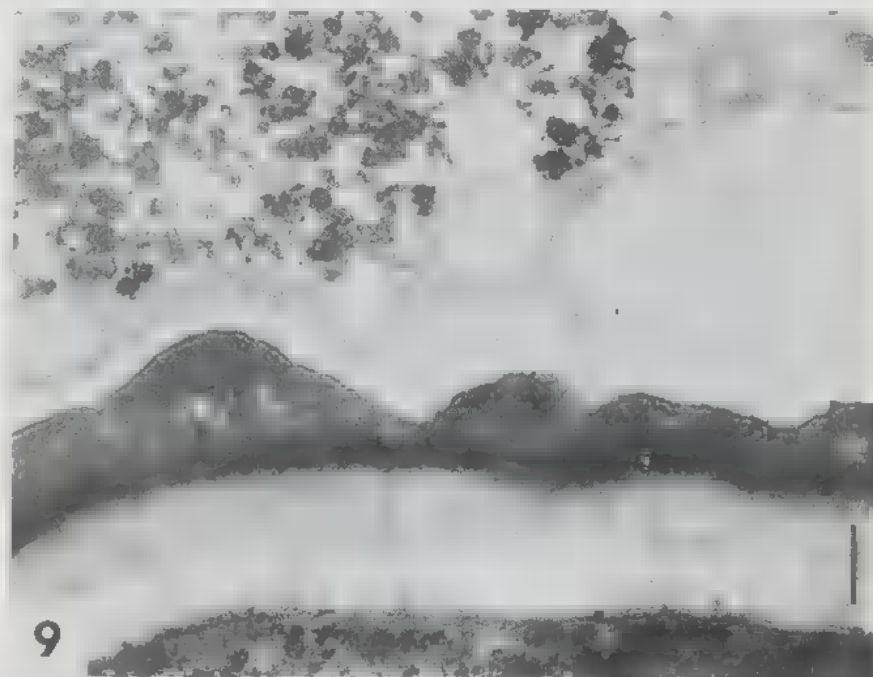


Fig. 9 et 10. — paroi des ascospores du *Terfezia claveryi* : évolution de l'exospore (suite).  
Échelle : 0,25  $\mu\text{m}$ .

Fig. 9 and 10. — ascospore wall in *Terfezia claveryi* : exospore evolution (continuation).  
Scale : 0,25  $\mu\text{m}$ .

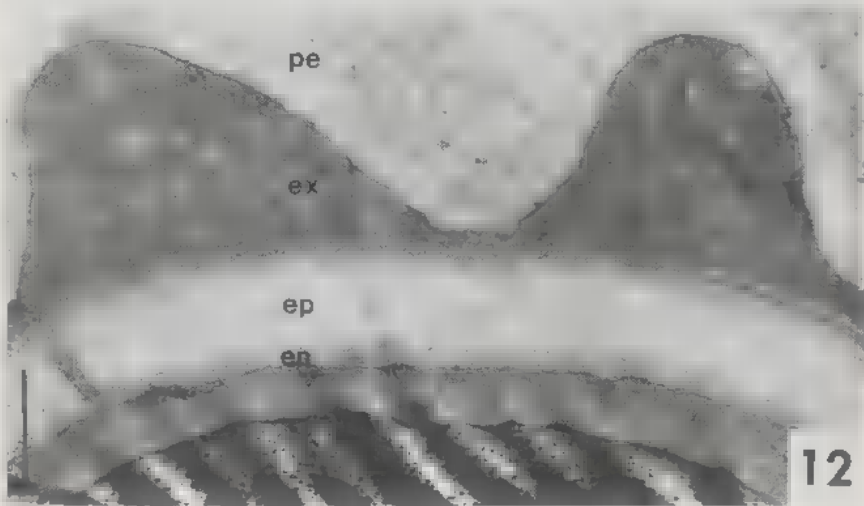
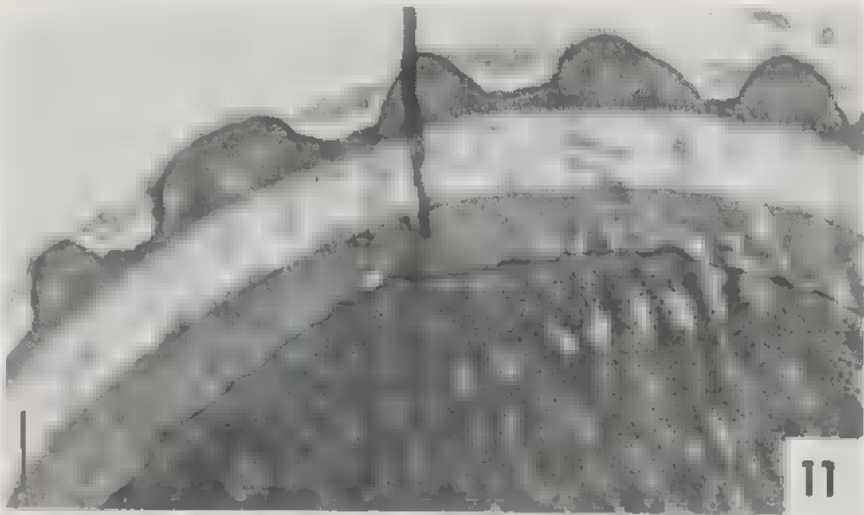


Fig. 11 et 12. — paroi des ascospores du *Terfezia claveryi*. Échelle : 0,5  $\mu$ m.

Fig. 11 : formation de l'endospore et rétraction de la périspore. Fig. 12 : structure finale. en : endospore; ep : épispore; ex : exospore; pe : périspore.

Fig. 11 and 12. — ascospore wall in *Terfezia claveryi*. Scale : 0,5  $\mu$ m.

Fig. 11 : endospore differentiation and perispore retraction. Fig. 12 : final structure. en : endospore; ep : epispore; ex : exospore; pe : perispore.